

201035027A

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルの経皮・吸入曝露実態の解析基盤
および経皮・吸入毒性評価基盤の確立とヒト健康
影響情報の集積に関する研究

平成 22 年度 研究報告書

研究代表者 堤 康央

平成 23 (2011) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルの経皮・吸入曝露実態の解析基盤
および経皮・吸入毒性評価基盤の確立とヒト健康
影響情報の集積に関する研究

平成 22 年度 研究報告書

研究代表者 堤 康央

平成 23 (2011) 年 5 月

目次

I. 研究報告書	
1. ナノマテリアルの経皮・吸入曝露実態の解析基盤の開発と曝露実態（細胞内・体内動態）情報の集積および免疫毒性・遺伝毒性・発がん性評価に関する研究	1
大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野	研究代表者 堤 康央
2. ナノマテリアルの肝内動態解析と一般毒性・肝毒性・若年性メタボリック症候群評価に関する研究	40
大阪大学大学院薬学研究科 生体機能分子化学分野	研究分担者 八木 清仁
3. ナノマテリアルの胎盤絨毛細胞への影響に関する研究	61
富山大学大学院医学薬学研究部 産科婦人科学	研究分担者 齋藤 滋
4. ナノマテリアルの乳幼仔動態解析と子ども（乳幼仔）健康影響（アトピーといった免疫毒性等）に関する研究	65
大阪府立母子保健総合医療センター研究所 免疫部門	研究分担者 柳原 格
5. 妊娠期ナノシリカ曝露の行動への影響の検討	70
藤田保健衛生大学総合医科学研究所	研究分担者 宮川 剛
6. ナノマテリアルの生殖器動態評価および繁殖毒性（精子・卵子・受精卵）・胚発生毒性評価に関する研究	80
神戸学院大学 薬学部 生命薬学部門 発生分化研究室	研究分担者 河合 裕一
7. フラーレンおよびカーボンナノチューブのラットにおける 28 日間反復経皮投与毒性に関する研究	89
(財)食品薬品安全センター-秦野研究所毒性部	研究分担者 桑形 麻樹子
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	102
III. 研究成果の刊行物・別冊	106

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

「ナノマテリアルの経皮・吸入曝露実態の解析基盤および経皮・吸入毒性評価基盤の確立
とヒト健康影響情報の集積に関する研究」

総括研究報告書

ナノマテリアルの経皮・吸入曝露実態の解析基盤の開発と 曝露実態（細胞内・体内動態）情報の集積 および各種ハザード解析に関する研究

研究代表者 堤 康央 大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野

研究要旨

昨今、ナノマテリアルの安全性が世界的に危惧されている（ナノ毒性；NanoTox）。しかしハザード情報の集積でさえ未だ不十分であるうえ、ナノマテリアルのリスク解析とその評価、そして将来的なリスク管理に必須となる曝露実態情報（吸収性や蓄積性、相互作用を含めた動態情報）に関しては、国内外を問わず皆無に等しい（例えばシリカの動態情報を追求している例は申請者らのグループのみと言っても過言ではない）。研究代表者はこれまで、非晶質ナノシリカ（nSP）をはじめとする種々ナノマテリアルのリスク解析に資するべく、曝露実態（動態）の定性的情報の集積を先駆けて報告すると共に、様々なハザード情報を先駆けて発信してきた（Nature; Vol.461, 2009 にトピック記事）。しかし依然として、経皮・吸入曝露後のナノマテリアルのリスク情報は圧倒的に不足しており、このままではナノマテリアル関連産業や知財立国としての本邦の発展が阻害されかねない。本観点から当該申請研究では、3ヶ年で①種々ナノマテリアル（サブナノ～ナノスケールで、かつ分散性に優れたnSPやサブナノ白金（snPt）、サブナノ銀（snAg）などをメインサンプルとする）の経皮および吸入（経鼻【経口腔・経気道を含む】）経路からの曝露実態（細胞内・体内動態）を先駆けて微量同定・定量化すること、および②情動・認知行動毒性やトキシコプロテオミクスなど、他に類を見ないハザード情報集積基盤手法を開発し、これらに基づきナノマテリアルのハザード情報を集積することにより、個々のナノマテリアルの曝露経路ごとの閾値を追求するなど、将来的なリスク評価・管理に必須の情報を集積すること、③OECD（経済協力開発機構）主導のナノマテリアルの安全性調査に関するスポンサーシッププログラムにおける我が国のマイルストーンに関して、イントララボ間・インターラボ間でのバリデーションを図りつつ、引き続きカーボンナノチューブやC60フラレン、ナノ酸化チタン、ナノ酸化亜鉛、nSP、snPt、snAgなどの経皮毒性情報を集積すること、④産業界と連携して既実用化あるいは実用化予定のナノマテリアルの安全性評価、さらには安全なナノマテリアルの開発支援をさらに加速させること、即ち、Nano-Safety Science（ナノ安全科学研究）を計画している。平成22年度研究では、①曝露実態として、微量同定・定量解析基盤の追求により、100 nm以下のnSPが経鼻吸収されること、snPt（1 nm）が経皮吸収されること、その後、全身分布し得ることなどを初めて見出した（吸入曝露は経鼻曝露で検討）。さらに、妊娠動物において全身分布したnSPが胎盤や胎仔に移行することを明らかとした。また②ハザード情報として、経皮・経鼻吸収されたnSPがアトピー性皮膚炎や脳炎、男性/女性不妊などを示し得ること、胎仔・母体毒性などを新たに見出し、かつトキシコプロテオミクスによりnSPの安全性バイオマーカーの同定にも成功した。さらにH22年度の検討で最も特筆すべき成果は、粒子表面をカルボキシル基やアミノ基で修飾することによって生体影響の発現を回避出来ることを先駆けて見出したことである。以上、本年度はナノマテリアルの安全性評価から得られた情報を安全なナノマテリアルの設計へとフィードバックする独自のNano-Safety Science研究が、ヒト健康・環境の安全確保を実現するだけでなく、本邦のナノマテリアル産業の発展とその支援、また国際貢献にあたって極めて有用であることを見出した。

A. 研究目的

近年、目覚ましい進歩を遂げているナノテクノロジー産業は、将来的に巨大な市場を期待できる分野である。ナノテクノロジー等を活用して、少なくとも一次元の大きさが 100 nm 以下になるように製造されたナノマテリアルは、特徴的な物性（サイズ、形状、表面性状など）を有しており、組織浸透性、電気的・磁氣的・光学的特性などの点において、従来までのサブミクロンサイズ以上の素材とは異なる新しい機能を発揮する。ナノマテリアルは、これまでの技術では成し得なかった機能向上や付加価値の可能性を提供する素材として世界中で注目されており、既に化粧品・食品・医薬品・電子部品分野をはじめとして、様々な分野で利用され始めている。

その一方で、最近になってナノマテリアルの新しい機能が、逆に、人体にとって好ましくない影響を發揮する可能性が指摘され始めている。こうした状況を受けて、OECD（経済協力開発機構）や ISO（国際標準化機構）などの国際機関は、本邦を含めた主要各国と連携してナノマテリアルの安全性評価を進めている。米国では、米国環境保護局や米国食品薬品局など、様々な公共機関が中心となって、国家規模でナノマテリアルの生体影響の評価が進められている。日本においても、経済産業省や厚生労働省、環境省によってナノマテリアルの安全性情報の収集とその手法の開発が進められている。日本は OECD の「工業ナノマテリアルに関する作業部会」において、フラーレンやカーボンナノチューブの安全性情報の収集を担当しており、今後もナノマテリアルの安全性情報を国際的に発信していくとしている。いずれの取り組みも、ナノマテリアルに特化した具体的な検討を行っているわけではなく、既存の化学物質関連規制の枠組みの中での安全性情報の収集が主要な目的である。その中でも、米国環境保護局によるナノマテリアル・スチュワードシッププログラムは、製造メーカーと連携して、ナノマテリアルの安全性情報を効率的に収集するための

興味深い取り組みである。こうした連携にみられるように、ナノテクノロジー産業の成長支援を重視した取り組みが、世界的に重要視されている。

現在流通しているナノマテリアルの大部分は、サブミクロンサイズ（数百 nm～数 μm ）であれば、古くから使われてきた“ありふれた素材”である。例えば、サブミクロンサイズの非晶質シリカは、物理化学的特性や生体影響に関する科学的知見が十分に蓄積された素材であり、食品添加物や化粧品基材として広く用いられてきた。しかし、同じ物質であっても、直径が 100 nm 以下のナノシリカになると、比表面積が大幅に増え、表面活性や電荷、体内吸収性が增大する可能性が考えられるなど、サブミクロンサイズの粒子とは異なる性質を發揮する。仮にナノマテリアルが体内に吸収された場合、極論を言えば、曝露局所だけではなく全身臓器でナノサイズであるが故の反応性を反映した未知の生体影響を發揮する可能性も考えられる。逆にこれらの考え方は、ナノマテリアルは吸収されなければ安全性が極めて高く、物理化学的特性を適切に制御すれば安全なナノマテリアルを創製できる可能性を示している。

こうした中、筆者らのグループは、産学連携で、シリカや銀、白金など、様々なナノマテリアルを対象として安全性評価とその評価手法の開発を進めている。これら一連の研究の目的は、①ナノマテリアルの体内吸収性や体内局在を定量的に解析する技術の開発と応用、②ナノマテリアルの物理化学的特性（大きさや形状など）と生体反応性の関係を精査すること、である。実際、試薬グレードの非晶質ナノシリカを対象に①②を実施したところ、100 nm 以下になると皮膚や消化管粘膜を介して体内に取り込まれるようになることが明らかとなった。また、体内吸収後の動態や生体反応性は、非晶質ナノシリカの表面性状によって左右され、特定の官能基で粒子表面を修飾することによって、生体影響を全く及ぼさない素材を開発出来る可能性を見出した。これらの検討で明らかとなった最も重要な点は、ナノシリカの物

理化学的特性を適切に制御することによってナノマテリアルの生体反応性を制御できる可能性を示したことである。これによって、有用性のみではなく、安全性をも付加価値として付与した新しいナノマテリアル製品開発の可能性を先駆けて示したと考えている。

本観点から当該申請研究では、3ヶ年で①種々ナノマテリアル（サブナノ～ナノスケールで、かつ分散性に優れた nSP や snPt, snAg などメインサンプルとする）の経皮および吸入（経鼻【経口腔・経気道を含む】）経路からの曝露実態（細胞内・体内動態）を先駆けて微量同定・定量化すること、および②情動・認知行動毒性やトキシコプロテオミクスなど、他に類を見ないハザード情報集積基盤手法を開発し、これらに基づきナノマテリアルのハザード情報を集積することにより、個々のナノマテリアルの曝露経路ごとの閾値を追求するなど、将来的なリスク評価・管理に必須の情報を集積すること、③OECD 主導のナノマテリアル安全性調査に関するスポンサーシッププログラムにおける我が国のマイルストーンに関して、イントララボ間・インターラボ間でのバリデーションを図りつつ、カーボンナノチューブや C60 フラーレン、ナノ酸化チタン、ナノ酸化亜鉛、nSP、snPt、snAg などの経皮毒性情報を集積すること、④産業界と連携して既実用化あるいは実用化予定のナノマテリアルの安全性評価、さらには安全なナノマテリアルの開発支援をさらに加速させること、即ち、ナノマテリアルの毒性研究（NanoTox）というよりもむしろ、ナノマテリアルの安全性を追求し、安全性情報の発信や、安全なナノマテリアルの開発やその支援を推進しようとする Nano-Safety Science（ナノ安全科学研究）を計画している。H22 年度は、上記①～④について、nSP や snPt に関する特筆すべき知見が得られたので報告する。

B. 研究方法

1. ナノ・サブナノマテリアル

本検討では、非晶質シリカは Micromod Partikeltechnologie 社（Germany）、snPt は polytech-net 社（Germany）より購入した。シリカは、一次粒子径が 100 nm（nSP100、濃度：50 mg/ml）、70 nm（nSP70、濃度：25 mg/ml）、50 nm（nSP50、濃度：25 mg/ml）、30 nm（nSP30、濃度：25 mg/ml）のものを使用した。また、nSP70 の表面をカルボキシル基修飾したものの（nSP70-C、濃度：25 mg/ml）、アミノ基で修飾したものの（nSP70-N、濃度：25 mg/ml）も用いた。さらに対照として、1000 nm（mSP1000、濃度：50 mg/ml）、300 nm（nSP300、濃度：50 mg/ml）のサブミクロンサイズ以上の従来型シリカを用いた。シリカのロットに関しては以降に適宜記載する。また、snPt は粒子径が 1 nm（濃度 5 mg/ml、Lot No. 10062801）のものを用いた。なお、以後の検討では、使用直前に粒子分散液を ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY (AS ONE) で 5 分間超音波処理し、更に 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した。尚、以降の実験では、特記しない限り、蛍光色素等で標識されていない未標識のサンプルを実験に供した。

2. 実験動物

BALB/c マウス（6-8 週齢、雌性）、妊娠 13 日目の BALB/c マウス（8-10 週齢、雌性）、Nc/Nga slc マウス（6-8 週齢、雄性）は、日本 SLC より購入した。また、本研究における動物実験の飼育および実験は医薬基盤研究所の実験動物施設において行い、医薬基盤研究所・大阪大学動物実験規定に準じた。

3. ナノシリカの皮内投与によるアトピー誘発

NC/Nga slc マウス（雄性 8 週齢）の耳介に、ヤケヒョウダニ抽出抗原（Dp；125 µg/ml）、シリカ（12.5 mg/ml）、Dp とシリカの混合溶液（Dp；125 µg/ml、シリカ；12.5 mg/ml）を 20 µl/ear で両耳介に皮内投与した。尚、本検討では、nSP30（Lot No. 07009 43-12）、nSP70（Lot No. 21499 43G）、nSP100（Lot No.

17008 43-01)、mSP300 (Lot No. 02808 43-01)、mSP1000 (Lot No. 04509 43-01) を用いた。

4. ナノシリカの経鼻投与

BALB/c マウスに超純水で各濃度に調整したシリカ分散液(mSP1000; Lot No. 4509 43-01、nSP300; Lot No. 02808 43-01、nSP100; Lot No. 17008 43-01、nSP70; Lot No. 21499 43G、nSP30; Lot No. 11809 43-01) を 20 μ l/mouse (片鼻 10 μ l) で 7 日間連続経鼻投与した。尚、投与は、ペントバルビタール麻酔下にて実施した。

5. ナノシリカの静脈内投与

妊娠 13 日目の BALB/c マウス (8-10 週齢、雌性) を日本 SLC より購入し、以降の実験に供した。妊娠 16 日目にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で種々の濃度に調整したシリカ分散液 (nSP70; Lot No. 1140843-01、nSP70-C; Lot No. 09909 43-02、nSP70-N; Lot No. 14309 43-02) を 100 μ l/匹で尾静脈内より投与した。

また、精巣影響を評価するために雄性マウスへの投与を実施した。実験には日本 SLC 株式会社より購入した 10 週齢の雄性 BALB/c マウスを用いた。0.8 mg の nSP300; 02808 43-01、nSP70; 21499 43G を 2 日連続でマウスに尾静脈内投与し、最終投与 24 時間後に精巣を回収した。尚、対照群には生理食塩水を同様に投与した。精巣は重量を測定後、透過型電子顕微鏡観察 (TEM) により非晶質ナノシリカの移行を検討すると共に、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色を用いて病理組織学的に解析した。

6. サブナノ白金の経皮投与

蒸留水に懸濁した 1 次粒子径 1 nm の snPt (濃度: 5 mg/ml、Lot No. 10062801) を、BALB/c マウスの耳介に (50 μ g/10 μ l/ear) で両耳に 7 日間連続で塗布した。最終投与 24 時間後に各種臓器 (胃・小腸・大腸など) を回収した。

7. 妊娠マウスにおけるナノシリカの生体内局在解析 (In vivo imaging、TEM)

DY676 (励起波長; 674 nm、蛍光波長; 699 nm) で蛍光標識された nSP70 (Lot No. 13708 15-01)、nSP70-C (Lot No. 05608 15-01) および nSP70-N (Lot No. 05008 15-01) を 0.8 mg/100 μ l/匹で尾静脈内投与した。シリカ投与 24 時間後に、イソフルラン (Abbott) で吸入麻酔をかけ、IVIS 100 imaging system (Xenogen corp.、Alameda) を用いて、シリカ粒子の体内動態を蛍光観察した。

また、電顕サンプルは下記のように調製した。すなわち、妊娠 16 日目の BALB/c マウスに PBS で懸濁した nSP70 (Lot No. 11408 43-01)、nSP70-C (Lot No. 09909 43-02)、nSP70-N (Lot No. 14309 43-02) を 0.8 mg/100 μ l/匹で 2 日間連続で尾静脈内投与した。最終投与から 24 時間後に、帝王切開により子宮を摘出した。胎仔肝臓、胎仔脳を摘出し、およそ 1 mm 角に切断した後、氷冷した 2.5% グルタルアルデヒド中で 2 時間固定した。以降の操作は、11. の項に詳述した。

8. ナノシリカの胎仔毒性・母体毒性評価

妊娠 16 日目の BALB/c マウスに PBS で 8 mg/ml に調整したシリカ分散液 (nSP70; Lot No. 1140843-01、nSP70-C; Lot No. 09909 43-02、nSP70-N; Lot No. 14309 43-02) を 0.8 mg/匹で尾静脈内投与した。2 日間連続投与し、最終投与から 24 時間後に、ネンブタール麻酔下で失血死させた。その後、子宮を回収し、子宮重量、吸収胎仔数、胎仔重量、胎盤重量を測定した。また、この時に回収した血漿中における可溶性 fms 様チロシンキナーゼ 1 (sFlt-1) 量を sFlt-1 ELISA Kit (R&D) を用いて測定した。尚、胎仔毒性・母体毒性の発現における血液凝固の影響を評価する目的で、必要に応じて、適宜、nSP70 投与後 3 時間前、さらに 3 時間後に PBS で 100 IU/ml に調整したヘパリン溶液を 10 IU/100 μ l/匹で腹腔内投与した。

9. ナノシリカのトキシコプロテオミクス

尾静脈投与による検討では、BALB/c マウスに、

生理食塩水で 8 mg/ml に調整した nSP70、nSP300、mSP1000、nSP70-C、nSP70-N をそれぞれ 0.8 mg/100 μ l/匹で投与した。投与後、経時的に (6 時間、24 時間、3 日、7 日) 血液を回収した。経鼻投与による検討では、BALB/c マウスに、nSP30、nSP70 をそれぞれ 20 μ l ずつ (0.5 mg/匹) 投与し、24 時間後に心臓採血により血液を回収した。いずれのサンプルも 12000 rpm、15 分間遠心操作を行った後に上清を血漿として回収した。この血漿を SDS 電気泳動に供し、CBB 染色したゲルから、目的のバンドを切り出し、100 μ l の脱色液 (50% acetonitrile/25 mM NH_4HCO_3) を加え、室温で 10 分間振盪した後、脱色液を取り除くことで脱色を行った。続いて 200 μ l の 100% acetonitrile を加え、ゲル片が白濁した後取り除き、遠心濃縮器 (CENTRIFUGAL CONCENTRATOR, TOMY) によって乾燥させることで脱水した。脱水したゲル片に 50 mM NH_4HCO_3 で 5 倍希釈した 20 μ l/mL の trypsin 溶液を 4 μ l 加え、37°C で 16 時間反応させることで、ゲル内の蛋白質を trypsin 消化した。消化後、ゲル片に抽出液 (50 μ l の 50% acetonitrile /0.1% formic acid 溶液) を加え、30 分間ボルテックスした後、抽出液を回収した。この操作を計 3 回 (2 回目は 50 μ l の 80% acetonitrile /0.1% formic acid 溶液、3 回目は 50 μ l の 100% acetonitrile で抽出) 繰り返すことで消化ペプチドを抽出した。ペプチド抽出液は遠心濃縮器によって濃縮し、14000 rpm、5 分間遠心後の上清をサンプルとして用いた。得られたサンプルは nano-flow liquid chromatography/tandem mass spectrometry (maXis, Bruker Daltonik GmbH) により解析した。回収した血漿中の haptoglobin、C Reactive Protein (CRP)、Serum Amyloid A (SAA) 量は、市販の ELISA kit (Life Diagnostics, Inc.) を用い測定した。なお、操作は添付のプロトコールに準じて行った。

10. 血液生化学検査

各種シリカの最終投与から 24 時間後に、マウ

スをペントバルビタール (ソムノペンチル ; Schering-plough Animal Health) で麻酔し、心臓より採血を行った。採血は、1/9 容量の 3.8% のクエン酸ナトリウム溶液であらかじめ湿らせたシリンジおよび注射針を用いて行った。この溶液を全血として血球検査に用い、残りを 1750 x g、15 分間、遠心分離して上清を血漿として回収した。得られた血漿は以下の血液生化学検査および血液凝固試験に供した。すなわち、血漿中のアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、血中尿素窒素 (BUN)、アルブミン (ALB) を生化学分析装置 FUJI DRICHEM 7000 (FujiFilm Medical Co. Ltd.) を用いて測定した。

また、血球検査は以下の方法で行った。各シリカ投与マウスから採取した全血を 0.1 mM EDTA 入りの PBS で 5 倍希釈し、多項目自動血球計測装置 VetScan HM2 (Abaxis) を用いて、総白血球数、リンパ球数、単球数、血小板数を測定した。血球検査は、電気抵抗法を用いて実施した。

11. 出血時間測定

各種シリカを経鼻投与し、最終投与から 24 時間後、Duke 法を用いて出血時間を測定した。マウスの耳にメスで 2 mm の切創をつくり、自然に流出する血液をろ紙で 30 秒毎に吸い取り、ろ紙に血液がつかなくなるまでの時間を出血時間とした。

12. 病理組織学的検査

各種シリカの最終投与から 24 時間後、マウスをペントバルビタール麻酔下で脱血死させ、各種臓器を摘出し、すぐに 10% 中性緩衝ホルマリンで固定した。頭部は、脳・皮膚を取り除き同固定液で固定し、EDTA 脱灰液 (Wako) にて脱灰後、鼻粘膜を摘出した。その後、各組織のパラフィンブロックを作成し、HE 染色を実施した。パラフィン切片をキシレンで脱パラフィン、エタノールで脱水処理、水洗後、ヘマトキシリンに 15 分間浸漬し、再度水洗した。この切片をエオジンに 1 分間浸漬した後、再度エタノールで脱水、キシレンで透徹処理後、パラフィンに封入した。以降、

切片の作成から所見の作成は、アプライドメディカルリサーチに依頼した。

13. ナノシリカの皮内投与がアトピー様病態の発症・悪化に及ぼす影響

上記、3.の方法に従って各種検体を投与し、最終投与の 24 時間後に耳介および脾臓、血漿を回収し、以降の検討に供した。病理組織学的解析においては、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (Wako) で固定した。上記 12 と同様に、その後の組織切片の作成および病理所見の作成はアプライドメディカルリサーチに委託した。アトピー病態において観察される代表的症状である痂皮、表皮肥厚、炎症性細胞の浸潤、浮腫については、その重症度を 0 から 4 の 5 段階でスコア化した。

また、同様にして回収した血漿を用いて、総 IgE 抗体の定量ならびに Dp 特異的 IgE の定量を行った。総 IgE の定量は市販の ELISA キット (BD Bioscience) を用いて添付のプロトコールに準じて実施した。一方で、Dp 特異的抗体の検出は、下記に準じて定量した。100 µg/ml Dp を ELISA プレートに加え、4°C で一晩放置した。PBS で希釈した 4%ブロックエース (大日本住友製薬) を室温で 2 時間反応させることでブロッキング後、各濃度に調製したサンプルを加えて、室温で 2 時間反応させた。これらのプレートを 0.05% Tween 20 含有 PBS で洗浄後、各濃度に調製した HRP 標識抗マウス IgG 抗体、HRP 標識抗マウス IgG1 抗体、ビオチン標識抗マウス IgG2a 抗体、あるいはビオチン標識抗マウス IgE 抗体を加えて室温で 2 時間反応させた。また、これら抗体はすべて Southern Biotechnology Associates 社のものを使用した。IgG2a および IgE の測定では、プレート洗浄後、HRP 標識ストレプトアビジンを加え、室温で 30 分間反応させた。再度、洗浄操作を行い、TMBZ を基質液を添加した。2N H₂SO₄ を添加することにより発色反応を停止させ、測定波長 450 nm、参考波長 620 nm における吸光度を測定した。

さらに、各種検体を皮内曝露した個体から回収した脾臓を用いて、ELISPOT アッセイを実施した。最終投与 24 時間後のマウスから脾臓を無菌的に摘出した後、70 µm セルストレーナー上で細胞を分散させ、1500 rpm、5 分間、4°C の条件で遠心することで、細胞を回収した。回収した細胞を RPMI 1640 (10% FBS、50 µM 2-ME、抗生物質を含む) で洗浄操作を 1 回行った後、0.75% NH₄Cl 溶液で懸濁、4°C で 5 分間インキュベートすることにより赤血球を溶血させた。さらに遠心操作を行った後、RPMI 1640 (10% FCS、1% anti-anti, 50 µM 2-ME、non-essential amino acids solution) で脾細胞を再懸濁した。ELISPOT アッセイキットに付属の 96 well ELISPOT plate に capture antibody を添加して PVDF 膜に 4°C で一晩固相化した。Capture antibody の除去後、PBS で希釈した 10% FCS 溶液を用い、室温で 2 時間ブロッキングした。さらに、マウスから回収した脾細胞を 5 × 10⁵ cells/well で 96 well ELISPOT plate に播種し、Dp 溶液を終濃度 100 µg/ml となるように添加し、37°C で 24 時間培養した。以降の操作は、添付のプロトコールに準じた。尚、スポット数の計測は、KS ELISPOT イメージングシステム (Carl Zeiss) を用いた。

14. 透過型電子顕微鏡を用いた nSP・snPt の体内/細胞内局在の解析

各サンプルを曝露した際の体内局在を透過型電子顕微鏡 (TEM) により評価した。最終投与から 24 時間後に、鼻粘膜、脳、肝臓、肺を摘出した。これらの組織をおよそ 1 mm 角にカットした後に、氷冷した 2.5%グルタルアルデヒド中で 2 時間固定した。固定液を冷 0.1 M リン酸緩衝液で置換した後、氷冷しながら 10 分間の洗浄作業を 3 回繰り返した。その後、冷 1%四酸化オスミウム液を加えて氷冷しながら 1 時間振盪し、後固定を行った。続いて、濃度の異なるエタノール中で脱水した後、酸化プロピレンで置換し、Epon-812 樹脂 (TAAB laboratories) で包埋した。作成したサンプルブロックをダイヤモンドナイフで薄

切し、厚さがおよそ 60 nm の超薄切片を作成して TEM で観察した。

15. 誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) を用いた snPt の経皮吸収性の解析

上記 6.の方法に従って snPt を塗布したマウスから、耳介 (塗布部位)、肝臓、腎臓、脾臓、肺、脳を回収した。これらの組織をテフロン製分解容器に採取し、硝酸 1 ml 及び過酸化水素 1 ml を加え、マイクロウェーブ分解装置 (MILESTONE ETHOS1、マイルストーンゼネラル社製) により分解した。分解液を水で 10 ml とし、これを試料溶液とした。分解後の試料溶液に、内標準として 0.2 µg/ml のタリウム溶液 0.1 ml を加えた。この試料溶液中の白金濃度を ICP-MS 装置 (Agilent 7500ce、アジレントテクノロジー社製) を用いて分析した。尚、分析条件は、試料導入速度 : 1.0 ml/min、プラズマガス : アルゴン 15 l/min、キャリアーガス : アルゴン 0.75 l/min、メイクアップガス : アルゴン 0.3 l/min、リアクションガス : ヘリウム、とし、測定質量数は 195 (白金)、205 (タリウム) とした。また、0-20 µg/l 範囲の白金溶液 10 ml に内標準として 0.2 µg/ml のタリウム溶液 0.1 ml を加えたものを検量線溶液として用いた。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

1. ナノシリカを妊娠期曝露した際の安全性評価 (胎仔毒性・母体毒性)

我々はこれまでに、非晶質ナノシリカの生殖発生毒性を評価し、過剰量を妊娠マウスに静脈内投与するハザード解析ではあるものの、nSP70 は nSP300 や mSP1000 とは異なり、①母体の肝臓のみならず、胎盤や胎仔にまで移行すること、② nSP70 が胎仔吸収や胎仔発育不全を誘発する可能性を見出してきた。そこで本検討では、nSP70 の胎仔吸収・胎仔発育不全誘発メカニズムの解明を図るとともに、これら胎仔毒性を呈さない安全なナノマテリアルの開発に向けた基礎情報の取

集を試みた。

本研究では、nSP70 の表面がカルボキシル基、アミノ基で修飾された nSP70-C、nSP70-N を用いて検討した。まず、詳細な体内動態を評価するために、TEM により体内動態を観察した。その結果、いずれの投与群においても、胎盤 (図 1a~d)、胎仔の脳 (図 1i~l) や肝臓 (図 1e~h) において黒いドット状の粒子が観察され、これらナノマテリアルは、血液胎盤関門を通過し、胎仔にまで移行することが明らかとなった。

続いて、胎仔毒性を呈さない安全なナノマテリアルの開発に向けた基礎情報の収集を目標に、表面修飾が nSP70 の胎仔毒性に及ぼす影響を評価した。まず、妊娠後期のマウスに過剰量の nSP70 を静脈内投与し、ハザード解析を試みた (図 2)。その結果、以前と同様に、nSP70 投与群において投与後から著しい母体体重・子宮重量の減少が観察され、胎仔吸収率の増加が認められた (図 2a~d)。さらに、以前の結果と同様に、nSP70 投与群では胎仔体重がコントロール群よりも 10% 以上減少し、胎仔発育不全を誘発していることが明らかとなった (図 2e,g)。一方で、nSP70-C、nSP70-N 投与群では、nSP70 投与群で認められた母体体重の減少 (図 2a)、子宮重量の減少 (図 2c)、胎仔吸収率の増加 (図 2b,d)、胎仔発育不全 (図 2e,g) は一切認められなかった。以上の結果から、表面修飾を施すことで、nSP70 による胎仔発育不全や胎仔吸収を回避できる可能性があることが示された。今後は、より長期間の投与による検討や、経皮・経口投与など実際の曝露経路における検討を推進するなど、より詳細な検討を進める必要があると考えられる。

次に nSP70 による胎仔毒性発現メカニズムの解明に向け、ヘパリン投与による胎仔毒性への影響を評価した (図 3)。抗凝固剤として使用されるヘパリンは流産や子宮内胎児発育遅延 (IUGR) を予防する目的で妊婦に対して使用されている。妊娠後期のマウスに nSP70 を投与するとともに、腹腔投与でヘパリンを投与した。その結果、

nSP70 投与によって認められた子宮重量、胎仔体重の減少が有意に抑制されるとともに (図 3b, d)、胎仔吸収率の増加も抑制される傾向が認められた (図 3c)。以上の結果は nSP70 による胎仔毒性には、凝固系の異常が関与している可能性を示唆している。一方で近年、ヘパリンが凝固系以外に、補体や好中球の活性化に関与しているという報告もあることから、これらの因子が nSP70 による胎仔毒性に関与しているかを検討する必要がある。正常な胎盤の形成は妊娠の維持に必須である。sFlt-1 は、妊娠時に主に胎盤から産生される物質であり、胎盤の血管新生に重要な役割を担う血管内皮細胞増殖因子(VEGF)に結合することで、胎盤の形成を調節する働きを持つ。各種ナノマテリアルを妊娠後期に投与した際の母体血中の sFlt-1 濃度を測定したところ、nSP70 投与群で、顕著な sFlt-1 濃度の減少が認められた (図 4a)。一方で、nSP70-C、nSP70-N 投与群では nSP70 投与群と比較して sFlt-1 濃度の減少は緩やかだった (図 4b)。さらに、nSP70 による sFlt-1 濃度の減少は、ヘパリン投与によって有意に抑制された (図 4c)。以上の結果は、nSP70 投与群において胎盤の機能異常が起きている可能性を示すものであり、その機能異常が、胎仔毒性の発現に関与している可能性が考えられる。

2. ナノシリカの精巣に対する影響評価

まず、ナノシリカを雄性マウスに尾静脈内投与し、TEM を用いてナノシリカの精巣移行性を評価した。その結果、nSP70 がセルトリ細胞内、精母細胞内、精子近傍にまで分布すること、精母細胞においてはその核内にまで移行することが明らかとなった (図 5)。なお、Control 群と nSP300 群の精巣ではこれらの粒子は認められなかった (Data not shown)。このことから、nSP300 は血液精巣関門を突破しない一方で、nSP70 が血液精巣関門を突破し、精細管内へ移行することが明らかとなった。またこの時、精巣重量や精巣の組織学的変化は認められなかったことから (図 6A, B)、nSP70 は精巣に移行するが、急性的な精巣

傷害性は小さいことが示唆された。

3. ナノマテリアルの安全性評価バイオマーカーの探索

まず、非晶質ナノシリカ曝露による血中での発現変動蛋白質の解析を試みた。BALB/c マウスに、nSP70 を 0.8 mg/匹で尾静脈より単回投与し、24 時間後に血液、及び血漿を回収した。この血漿を SDS-PAGE に供し、発現変動蛋白質を評価した。その結果、コントロールとして生理食塩水 (saline) を投与した群と比較し nSP70 投与群において、分子量約 37 kDa のバンドの濃さに違いが認められた (図 7)。そこで、この部位のバンドを切り出し、LC/TOF/MS により対応する蛋白質の同定を試みたところ、いくつかの蛋白質が同定され (表 1)、その中で急性期蛋白質の一種である haptoglobin を候補蛋白質として見出した。

非晶質シリカ曝露後の血中 haptoglobin 量を定量解析するために、BALB/c マウスに nSP70、nSP300、mSP1000 をそれぞれ 0.8 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 24 時間における血中 haptoglobin 量を ELISA により測定した。なお、nSP70、nSP300、mSP1000 投与群において、一般的な組織傷害マーカーとして知られている ALT、AST、BUN 値の有意な変動は認められなかった (data not shown)。血中 haptoglobin 量を測定したところ、mSP1000 投与群では、saline 投与群と比較しほとんど変化は認められなかった。一方で、nSP300 投与群でわずかに産生量の増加が見られ、さらに、nSP70 投与群では saline 投与群と比較して有意に増加することが明らかとなった (図 8A)。次に、非晶質シリカ曝露後の血中 haptoglobin 量の発現変動を経時的に解析するために、BALB/c マウスに nSP70、nSP300、mSP1000 をそれぞれ 0.8 mg/匹で尾静脈投与し、投与後 6 時間、24 時間、3 日、7 日における血中 haptoglobin 量を ELISA により測定した。その結果、mSP1000 投与群では、いずれの時間においても血中 haptoglobin 量の増加は認められなかった (図 8B)。一方で、nSP70、nSP300 投与群

では、投与後 24 時間において血中 haptoglobin 量が最大ピークを示すことが明らかとなった。さらに、投与後 3 日においても、nSP70 投与群の血中 haptoglobin 量は saline 投与群と比較し有意に増加していた。次に、BALB/c マウスに nSP70 を各投与量 (0.05 mg/匹、0.2 mg/匹、0.8 mg/匹) で尾静脈投与し、投与後 24 時間における血中 haptoglobin 量を ELISA により測定した。その結果、0.2 mg/匹、0.05 mg/匹で投与した群では、saline 投与群と比較しほとんど血中 haptoglobin 量の増加は認められなかった (図 8C)。これらの結果から、血中 haptoglobin 量が、非晶質シリカの粒子径の減少に伴い増加すること、また、非晶質ナノシリカの投与量依存的に増加することが明らかとなった。

急性期蛋白質には、haptoglobin 以外の典型的なものとして CRP、SAA が知られている。そこで、非晶質シリカ投与後の血中 CRP、SAA 量の発現変動を評価した。BALB/c マウスに nSP70、nSP300、mSP1000 をそれぞれ 0.8 mg/匹で投与し、投与後 6 時間、24 時間、3 日、7 日における血中 CRP、SAA 量を ELISA により測定した。その結果、CRP、SAA とともに非晶質シリカの粒子径の減少に伴い産生量が増加し、nSP70 投与群でのみ saline 投与群と比較して有意に産生量が増加することが明らかとなった (図 9)。また、SAA は haptoglobin と同様に投与後 24 時間で産生量の増加が認められた (図 9B)。一方で、CRP においては、投与後 24 時間においても産生が認められたが、投与後 6 時間で最大ピークを示すことが明らかとなった (図 9A)。これらの結果から、haptoglobin のみならず、CRP、SAA をはじめとする急性期蛋白質が、非晶質ナノシリカ曝露による生体影響を予測する安全性評価マーカーとなり得ることが示唆された。

ナノマテリアルはすでに我々の生活に広く浸透し、我々は、様々な経路からナノマテリアルに曝露される機会に溢れている。したがって、有用な安全性評価マーカーを探索するためには、実際

の曝露経路を想定してナノマテリアルを投与した時の血中での発現変動を評価することが必要である。そこで、非晶質ナノシリカを経鼻投与した時の血中 haptoglobin、CRP、SAA 量を解析した。BALB/c マウスに nSP30、nSP70 をそれぞれ 0.5 mg/匹で経鼻投与し、投与後 24 時間における血中 haptoglobin (図 10A)、CRP (図 10B)、SAA (図 10C) 量を ELISA により測定した。その結果、いずれの急性期蛋白質も nSP70 投与群では有意な上昇は認められなかったが、nSP30 投与群において、saline 投与群と比較し有意に産生量が上昇することが明らかとなった。これらの結果から、急性期蛋白質が非晶質ナノシリカの経鼻曝露により誘発される生体影響をも予測し得ることが示唆された。

近年、ナノマテリアルがその物性や形状の違いにより、異なる生体影響や細胞応答を示すことが報告されている。例えば、これまでに申請者は、過剰量の非晶質シリカを曝露した場合のハザード評価において、非晶質シリカの表面をカルボキシル基、アミノ基といった官能基で表面修飾することで、非晶質シリカによる炎症反応や細胞障害性が抑制されること、さらには、未修飾の nSP70 曝露による急性毒性や肝毒性、血液凝固障害などを減弱することを見出してきた。そこで、急性期蛋白質が非晶質ナノシリカ曝露による負の生体影響を予測する安全性評価マーカーになり得るかを評価するために、表面修飾を施した nSP70 を用い血中急性期蛋白質量の発現変動を解析した。BALB/c マウスに nSP70、nSP70-C、nSP70-N をそれぞれ 0.8 mg/匹で尾静脈投与し、投与後 24 時間における血中 haptoglobin (図 11A)、CRP (図 11B)、SAA (図 11C) 量を ELISA により測定した。その結果、前述の結果と同様に、未修飾の nSP70 投与群ではいずれの急性期蛋白質も、saline 投与群と比較し有意にその産生量の増加が認められた。一方で、nSP70-C、nSP70-N 投与群では未修飾の nSP70 投与群と比較し、血中 haptoglobin、CRP、SAA 量はいずれも有意に産

生量が減少することが明らかとなった。このことから、急性期蛋白質が、非晶質ナノシリカ曝露による負の生体影響を予測する安全性評価マーカーとなり得ることが示唆された。

4. ナノシリカの皮内曝露がアトピー様症状の発症/悪化に与える影響

まず、耳介部の腫脹を指標に、シリカのアトピー様症状への影響を評価した。その結果、nSP300 や、mSP1000 といった、所謂サブミクロンサイズ以上のシリカと Dp の混合溶液を投与した群の腫脹は、Dp 単独投与群とほぼ同程度であった (図 12A)。一方で、nSP30、nSP70、nSP100 といった、100 nm 以下のナノシリカを適用した群では、Dp 単独よりも 2-5 倍程度、顕著な耳介の腫脹が観察された。次に、投与局所である耳介部の、HE 染色による病理組織学的に観察し (図 12B~E)、アトピー病態において観察される代表的症状についてその重症度をスコア化した (図 12F)。その結果、どの大きさのシリカを適用した群においても、炎症性細胞の浸潤数が Dp 単独投与群よりも顕著に増大した。さらに、病理学的には Dp 単独の投与群では表皮の肥厚が全く観察されなかったが、粒子径 300 nm 以下のシリカを適用した群で肥厚が認められた。さらに興味深い事に、浮腫、痂皮の形成は、粒子径 100 nm 以下のシリカを投与した群においてのみ観察された (図 12F)。また、アトピー病態におけるかゆみ、炎症といった病態発現に重要な働きをする肥満細胞の浸潤数をトルイジンブルー染色し (図 12G~J)、スコア化 (図 12K) することにより評価したところ、シリカの粒子径の減少と、肥満細胞の浸潤数には正の相関関係が認められた。以上の検討により、Dp により誘発されるアトピー病態は、シリカの投与により増悪され、この効果は、シリカの粒子径が小さいほど、また、特に 100 nm 以下のナノサイズとなることで顕著に誘導されることが明らかとなった。

一般に、アトピー病態の重症化には、総 IgE またはアレルゲン特異的 IgE の産生増加が関与す

ると言われている。そこで、アトピー様病態の重症化における総 IgE や Dp 特異的 IgE の関与を精査するため、血漿中の総 IgE、並びに Dp 特異的 IgE 量を ELISA にて定量した。その結果、総 IgE の産生量はシリカの粒子径の減少に依存して顕著に上昇した (図 13A)。回帰分析の結果から、総 IgE の産生とシリカの粒子径は負の相関を持つことが明らかとなった (図 13B)。したがって、Dp とともに投与するシリカの粒子径は小さければ小さいほど、アトピー病態がより重症化する可能性が示唆された。一方で、Dp 特異的な IgE の産生に関しては、Dp 単独投与群と比較して、シリカ共投与群で産生の上昇が観察されるものの、シリカの粒子径、特に 100 nm 以下の粒子径による産生の変化などは見られなかった (図 13C)。このことから、または 100 nm 以下のナノシリカ投与によってのみ誘発される本アトピー病態の増悪には、抗原特異的 IgE ではなく、総 IgE の産生が関与する可能性が考えられた。

続いて、投与局所である耳介の病変部におけるサイトカイン産生の変動を解析し、ナノシリカによるアトピー悪化メカニズムの解明に迫った。アトピーなどのアレルギー病態の急性期においては、一般に Th2 型の免疫応答が過剰に促進され、一方で、Th1 型の免疫応答は抑制される傾向にあることが知られている。そこでまず、我々は皮膚病変部における Th1/Th2 バランスを、IFN- γ 、Th2 IL-4、IL-5、IL-13 産生量を指標に評価した (図 14A)。その結果、とりわけ 300 nm 以下のシリカを Dp とともに投与した群において、顕著な IL-4 の産生上昇、すなわち Th2 応答の増強が認められた。その一方、300 nm 以下のシリカを共投与した群においては、IFN- γ の産生は認められず、IL-4 産生の顕著な上昇のみが観察された。したがって、これら病態において、通常のアトピー病態と同様に Th2 型の免疫応答が促進されることが病態の増悪につながっていることが示唆された。また、Th2 型サイトカインである IL-5 や、IL-13 に関して、シリカ投与群で、Dp 単独投与群

と比較し、その産生の減少が観察された。IL-5やIL-13に関して、その産生は病態の進行度、段階によりその変動が観察されることが知られるため、さらに時間を追って解析することで、より詳細な情報が得られるものと考えられる。次に、近年、単独でもアトピー病態の発症を招き、アトピーの発症や悪化に深く関与することが報告された上皮性のサイトカインであるIL-18とThymic stromal lymphopoinetin (TSLP)の産生を解析した(図14B, C)。その結果、回帰分析の結果からも明らかなように、Dpとともに共投与したシリカの粒子径の減少と相関した顕著なIL-18の産生が観察された。この結果は総IgEの産生の結果と良く一致していた。また、TSLPに関して、その産生上昇は、100 nm以下のシリカを共投与した群でのみ観察された。これは、耳介の腫脹のデータ(図12A~E)や浮腫・痂皮の形成とも一致し、シリカの粒子径が100 nm以下となることによって誘導される病態は、このTSLPの産生により引き起こされている可能性が考えられた。以上、本病態において100 nm以下の粒子径のナノシリカで誘導された病態の発症には、IL-18やTSLPといった上皮性のサイトカインの産生が関与している可能性が示唆された。一方で、シリカによるこれらサイトカイン産生のメカニズムに関してはより詳細な検討を要する。

最後に、ナノシリカによるアトピー病態悪化のメカニズム解明を念頭に、全身面での免疫応答について、Dp特異的抗体産生、脾臓中でのDp特異的細胞頻度の解析により評価した。まずDp特異的IgGの力価をELISAにて評価した(図15A)。その結果、粒子径100 nm以下のナノシリカ投与群で顕著に上昇することが分かった。さらに、このIgG抗体のサブタイプを調べたところ、Th2型の免疫応答が促進された場合にその産生が上昇するIgG1に関しては、300 nm以下のシリカを投与した群において有意に力価が上昇した。一方でTh1型の免疫応答が促進された場合にその産生が上昇するIgG2aの力価は、最も小さいnSP30

を投与した群においてのみ有意に上昇した。これら免疫応答を詳細に解析するため、脾臓中におけるDp特異的IFN- γ 、IL-4産生細胞頻度を、ELISPOT法を用いた解析により評価した(図15B)。Dp特異的IFN- γ 産生細胞頻度に関しては、IgG2a抗体産生と相関し、nSP30を投与した群でのみその頻度上昇が観察された。一方でIL-4産生細胞頻度は、回帰分析の結果からも明らかなように、投与したシリカの粒子径の現象と相関した産生上昇が認められた。したがって、シリカの粒子径の減少により全身でのTh2型免疫応答が促進されることが、本アトピー病態において、粒子径依存的なアトピー様病態の悪化が観察される原因の一つであると考えられる。また、最も重症度の高い病態が観察される、nSP30投与群でのみTh1型の免疫応答の促進が観察されたことは非常に興味深い。現在、安全性の高いナノシリカの創製に向けて、nSP30の皮内曝露によるアトピー病態の悪化とTh1免疫増強の関係を精査している。

5. ナノシリカを吸入(点鼻)曝露した際の安全性評価

まず、各シリカを経鼻投与した際の体内吸収性を評価した。各シリカを経鼻投与マウスから回収した鼻腔組織(図16a~e)、肺(図16f~j)、肝臓(図16k~o)および脳(図16p~t)をTEMで観察した。その結果、mSP1000、nSP300は投与局所である鼻粘膜の粘膜上皮細胞内やII型肺胞上皮細胞内においてのみ観察された。一方で、粒子径が100 nm以下のシリカ(nSP100、nSP70、nSP30)は投与局所だけではなく、肝細胞内や脳のグリア細胞内においても粒子が認められた。尚、nSP70を28日間経鼻投与したマウスの脳および鼻腔組織をTEM-EDX解析したところ、黒いドット状に見える粒子が確かにシリカであることを確認した(図17)。これらの結果は、経鼻曝露したナノシリカが体内に吸収されて全身に分布し得るため、全身臓器を対象とした安全性評価が必須であることを示唆している。

これらの結果を受けて次に、投与局所である鼻粘膜や肺、さらに全身の主要臓器である脳・肝臓・腎臓の病理組織学的検査を実施した（表 2、図 18a～c）。その結果、鼻粘膜では nSP70、nSP30 投与群においてのみ極軽度ではあるものの組織障害が認められた。また、脳・肝臓においては、サブミクロンサイズ以上のシリカ投与群はコントロール群と比較して、病理組織学的変化はほとんど認められなかったが、nSP70、nSP30 投与群においては、コントロール群と比較して軽度の組織障害を誘導していることが明らかとなった。肺・腎臓はいずれのシリカ投与群においてもコントロール群と比較して病理組織学的変化は見られなかった。以上の結果から、nSP70、nSP30 を経鼻投与することによって、サブミクロンサイズ以上のシリカとは異なる生体影響を及ぼす可能性が示され、これは経鼻吸収性の結果と良く一致していた。

上記の病理組織学的解析により nSP70、nSP30 において肝障害が発現している可能性が示されたため、次に各マウスから回収した血漿を用いて、肝障害マーカーを中心に ALT、BUN、ALB を測定した（図 19a～c）。一般に ALT は肝細胞の破壊により血中に流出するため肝障害の指標となり、BUN、ALB は肝臓で合成されるためこちらも肝障害マーカーとして用いられる。上記三種の肝障害マーカーを測定した結果、粒子径が小さくなるにつれて ALT の上昇傾向が認められ、nSP70 投与群においてはコントロール群と比較して有意な上昇であった。一方で、BUN と ALB はいずれのサイズのシリカ投与群においてもコントロール群と比べ変化は認められなかった。

続いて、血中の血球成分の変動についても解析した。その結果、粒子径が小さくなるにつれて、血小板の減少が認められ、nSP30 投与群における血小板数は正常値（BALB/c マウス； $250\text{--}450 \times 10^9/\text{l}$ 参考文献）を下回っていた（図 20a）。この現象は、nSP70 および nSP30 の投与量依存的に生じることを確認した（図 21a, b）。リンパ球、

単球、白血球はいずれのシリカ投与群においてもコントロール群と比較して変化は見られなかった。一般的に血小板数の減少は、血液凝固異常を誘発するため、本結果は、nSP70、nSP30 への経鼻曝露が血液凝固系に何らかの影響を及ぼす可能性を示唆している。そこで血小板の減少による生体影響を精査する目的で、各マウスの出血時間を Duke 法により比較した。その結果、nSP70、nSP30 を経鼻投与したマウスの出血時間はコントロール群と比較して顕著に延長していた（図 22）。以上の結果から、nSP70、nSP30 は、体内吸収されることによって全身血管内において持続的な凝固活性化を誘導し、凝固因子や血小板を消費するため出血症状を呈する病態、いわゆる消費性血液凝固障害を誘発している可能性が示された。

本検討の結果から、nSP70、nSP30 を経鼻投与することによって、粒子は投与局所だけではなく全身循環して脳や肝臓にまで達することが明らかとなった。また、nSP70、nSP30 は、経鼻吸収性を反映して血小板の減少や肝障害、消費性凝固障害を誘発することが明らかとなった。これらの知見は、ナノシリカを経鼻曝露した際のリスク解析に資する基盤情報になるものと考えられる。本節の結果の中でも、ナノシリカが脳内に移行したという事実は大変興味深い現象である。脳は、生体の認知・情動・記憶・感覚等をつかさどる組織であるため、例え微量であっても長期的に曝露した際には何らかの悪影響が生ずる可能性がある。例えば、ナノ酸化チタンは経鼻投与により脳内へ移行して脳組織で酸化ストレスや TNF- α 、IL-1 β などを産生すること、また、銅ナノ粒子が経鼻投与後に肝臓・腎臓・脳に局在し、組織障害を誘導することなどが報告されている。これらの情報を踏まえて、ナノシリカについても脳や脳機能に対する影響を精査する必要がある。

6. snPt の体内吸収性の評価

蒸留水に懸濁した 1 次粒子径 1 nm の試薬グレードの snPt（5 mg/ml）を、BALB/c マウスの

耳介に (50 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}/\text{ear}$) で両耳に 7 日間連続で塗布した。最終投与 24 時間後に各種臓器を回収した。これらの臓器を用いて TEM によるナノシリカおよび snPt の局在を観察した。まず、snPt 曝露個体の投与皮膚を観察したところ、経皮投与した snPt は、投与部位の耳介皮膚のみならず、脳、肺、肝臓、腎臓、頸部リンパ節にまで到達していた (図 23)。以上の結果は、snPt が生体内で最も強固なバリアーである皮膚角質層を突破して体内に吸収されて血液循環することを示している。

続いて、同様の方法で snPt を塗布したマウスにおける、snPt の体内吸収性を ICP-MS を用いて定量した (図 24)。その結果、snPt は大部分が塗布部位である耳介に残存 (90 ppm) していたが、肝臓や、腎臓、脾臓、肺、脳において、それぞれ 0.40、1.1、0.23、0.22、0.13 ppm 程度検出された。本検討では、各マウスがお互いの耳を舐めることによって経口的に体内に吸収されたことを否定出来ない。しかしながら、snPt を経口投与した場合と経皮投与した場合では、snPt の組織分布パターンが全く異なることを見出している。これらの知見を重ね合わせると、snPt が経皮吸収される可能性と投与経路の違いによって体内吸収後の組織移行性が劇的に変化する可能性が示された。今後は、経口的な体内吸収の可能性を除外した条件での snPt の経皮吸収量や体内局在の定量や、到達した各種臓器を対象とした詳細な安全性評価などリスク解析に資する基礎情報の収集が必須である。

E. 結論

冒頭でも述べたように、ナノ材料は産業化されてからの歴史が浅く、今後の応用可能性・市場規模は計り知れないものがある。従って、ナノ材料の危険性だけが無闇に強調され、社会受容が損なわれることだけは絶対に避けねばならない。そのためには、ナノ材料の曝露量や生体影響に関する科学的な情報の収集・蓄積

が必須であるのは勿論のこと、安全なナノ材料の創製を目指した学術的な基礎研究が不可欠である。筆者らは、現在、ヒトの健康確保と豊かな社会の実現を目指し、産官学連携で、ナノ材料の安全性確保や安全なナノ材料の開発支援、開発相談などに取り組むなど、Nano-Safety Science (ナノ安全科学研究) にチャレンジしている。そのために、医薬工学領域の大学・研究所の先生方に加え、平成 22 年度には日本化粧品工業連合会、日本化学工業協会、また平成 23 年度より社団法人ビジネス機械・情報システム産業協会 (JBMIA) など、多くのメーカーの方々と協力体制を築きつつ、議論を進めており (平成 22 年度は 2 回の班会議を実施。その他、定期的にメール・電話等で情報/意見交換を実施。)、安全で安心な健康社会の実現、そしてナノ産業の発展に尽くしていきたいと考えている。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

① 論文発表

1. Morishige T., Yoshioka Y., Tanabe A., Yao X., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Titanium dioxide induces different levels of IL-1beta production dependent on its particle characteristics through caspase-1 activation mediated by reactive oxygen species and cathepsin B,. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 392(2):160-165, 2010.
2. Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Arimori A., Isobe M., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Itoh N., Tsunoda S.,

- Tsutsumi Y. : Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica nanoparticles on Langerhans cells., *Pharmazie.*, 65(3):199-201, 2010.
3. Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Morishita Y., Yoshida T., Fujimura M., Kayamuro H., Nabeshi H., Yamashita T., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Kawai Y., Mayumi T., Yoshikawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Carbon nanotubes elicit DNA damage and inflammatory response relative to their size and shape., *Inflammation.*, 33(4):276-80, 2010.
 4. Morishige T., Yoshioka Y., Inakura H., Tanabe A., Yao X., Narimatsu S., Monobe Y., Imazawa T., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : The effect of surface modification of amorphous silica particles on NLRP3 inflammasome mediated IL-1 β production, ROS production and endosomal rupture., *Biomaterials.*, 31(26):6833-6842, 2010.
 5. Morishige T., Yoshioka Y., Inakura H., Tanabe A., Yao X., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S.: Cytotoxicity of amorphous silica particles against macrophage-like THP-1 cells depends on particle-size and surface properties., *Pharmazie.*, 65(8):596-599, 2010.
 6. Higashisaka K., Yoshioka Y., Yamashita K., Morishita Y., Fujimura M., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Yoshikawa T., Itoh N., Tsutsumi Y. : Acute phase proteins as biomarkers for predicting the exposure and toxicity of nanomaterials., *Biomaterials.*, 32(1):3-9, 2011. <Leading Opinion Paper>
 7. Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Matsuo K., Arimori A., Isobe M., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Nakagawa S., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application., *Biomaterials.*, 32(11):2713-2724, 2011.
 8. Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes., *Part. Fibre. Toxicol.*, 8:1, 2011.
 9. Li X., Kondoh M., Watari A., Hasezaki T., Isoda K., Tsutsumi Y., Yagi K.: Effect of 70-nm silica particles on the toxicity of acetaminophen, tetracycline, trazodone, and 5-aminosalicylic acid in mice. *Die Pharmazie*, in press.
 10. Isoda K., Hasezaki T., Kondoh M., Tsutsumi Y., Yagi K. Effect of surface charge on nano-sized silica particles-induced liver injury. *Die Pharmazie*, in press.
 11. Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Mimura K., Morishita Y., Nozaki M., Yoshida T., Ogura T., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Monobe Y., Imazawa T., Aoshima H., Shishido K., Kawai Y., Mayumi T., Tsunoda S., Itoh N.,

Yoshikawa T., Yanagihara I., Saito S., Tsutsumi Y. : Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice., Nature Nanotechnology, 6(5):321-328, 2011.

【総説・その他】

1. 吉川友章, 吉岡靖雄, 角田慎一, 堤 康央 : 化粧品ナノマテリアルの安全性評価の現状と技術的課題～安全なナノマテリアルの開発支援に向けて～., コスメティックステージ, Vol.4(4), 44-48, 2010.
2. Nabeshi H., Yoshikawa T., Imazawa T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Safety Assessment of Nanomaterials Using Toxicokinetics and Toxicoproteome Analysis., Yakugaku Zasshi, 130(4):465-470, 2010.
3. 吉川友章, 吉岡靖雄, 角田慎一, 堤 康央 : ナノ材料のリスク評価と安全性対策『非晶質ナノシリカの経皮吸収性/生体内動態と安全性との関連追求』., フロンティア出版, 44-53, 2010.
4. 堤 康央 : ナノマテリアルのヒト健康への影響., 阪大 NEWS LETTER., Vol.48 (6) : 19, 2010.
5. 吉川友章, 吉岡靖雄, 堤 康央 : 革新的技術/素材の恩恵を最大限に享受した豊かな社会の構築に向けて ～ナノマテリアルの安全性確保基盤の構築を例に～., 生産と技術, 6(4) : 52-56, 2010.
6. Yoshioka Y., Yoshikawa T., Tsutsumi Y. : Nano-safety science for assuring the safety of nanomaterials., Nippon Eiseigaku Zasshi., 65(4):487-492, 2010.
7. Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Recent topics of NanoTox studies for their safety –Foreword–., Yakugaku Zasshi, 131(2):193-194, 2011.

8. Tsunoda S. : Transdermal penetration and biodistribution of nanomaterials and their acute toxicity in vivo., Yakugaku Zasshi, 131(2):203-207, 2011.
9. Yoshikawa T. : Development of NanoSafety forecasting system from the viewpoint of nanomaterial-protein interaction., Yakugaku Zasshi, 131(2):209-213, 2011.
10. Abe Y. : Safety studies of nanomaterials about intracellular distribution and genotoxicity., Yakugaku Zasshi, 131(2):215-219, 2011.
11. Yoshioka Y. : NanoSafety studies of nanomaterials about biodistribution and immunotoxicity., Yakugaku Zasshi, 131(2):221-224, 2011.
12. Nagano K. : Biodistribution of nanosilica particles in pregnant mice and the potential risk on the reproductive development., Yakugaku Zasshi, 131(2):225-228, 2011.

② 学会発表

【シンポジウム等 : 合計 6 件】

1. 吉岡靖雄, 堤 康央 : ナノマテリアルの安全性確保を目指して., 第 80 回日本衛生学会学術総会, 仙台, 2010 年 5 月.
2. 堤 康央 : 安全なナノマテリアルの開発支援に向けた NanoTox 研究への取組., 平成 22 年度日本環境変異原学会公開シンポジウム., 東京, 2010 年 5 月.
3. 堤 康央 : ナノマテリアルの経皮・吸入曝露実態の解析基盤および経皮・吸入毒性評価基盤の確立とヒト健康影響情報の集積に関する研究., 厚労省ナノマテリアル研究に関する研究者間意見交換会., 東京, 2010 年 8 月.
4. 堤 康央 : ナノテクノロジーを活用した医療、化粧品、食品の安全性と今後の課題., 第 42

回大阪大学中之島講座「いまを読み解く -医療・都市-」『先端医療とその課題』, 大阪, 2010年10月.

5. 堤 康央:薬学における毒性学研究 ~ナノマテリアルの安全確保を一例に~, 平成 22年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部理化学部会研修会., 和歌山, 2010年12月.
6. 堤 康央:ナノマテリアルの社会受容の促進を目指した安全性研究., 日本学術会議レドックス生命科学第170委員会主催「レドックス・ライフイノベーションシンポジウム」., 東京, 2011年3月.

【国内学会発表:合計34件】

1. 吉川友章, 吉岡靖雄, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 今澤孝喜, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央:ナノ含有食品の安全性確保および安全なナノ含有食品の開発に向けて-1:ナノマテリアルの粒子サイズと血液凝固系への影響., 日本食品衛生学会第99回学術講演会, 東京(東京), 2010年5月.
2. 吉岡靖雄, 吉川友章, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央:ナノ含有食品の安全性確保および安全なナノ含有食品の開発に向けて-2:ナノマテリアルの表面電荷と免疫系への影響., 日本食品衛生学会第99回学術講演会, 東京(東京), 2010年5月.
3. 吉川友章, 吉岡靖雄, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 今澤孝喜, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央:ナノ化粧品の安全性確保および安全なナノ化粧品の開発に向けて-1:ナノマテリアルの表面性状が血液凝固系に与える影響., 第35回日本化粧品学会, 東京(東京), 2010年6月.
4. 吉岡靖雄, 吉川友章, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 今澤孝喜, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央:ナノ化粧品の安全性確保および安全なナノ化粧品の開発に向けて-2:ナノマテ

リアルな粒子径と免疫系への影響., 第35回日本化粧品学会, 東京(東京), 2010年6月.

5. 吉岡靖雄, 森重智弘, 角田慎一, 向 洋平, 岡田直貴, 堤 康央, 中川晋作:非晶質ナノシリカの粒子特性と自然免疫応答の連関評価とそのメカニズム解析., 第37回日本トキシコロジー学会学術年会, 那覇(沖縄), 2010年6月.
6. 吉川友章, 鍋師裕美, 赤瀬貴憲, 栃木彩恵子, 平井敏郎, 仲里泰太郎, 松山恵吾, 近藤小百合, 長野一也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 鎌田春彦, 今澤孝喜, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央:ナノマテリアルの安全性確保に向けて:非晶質ナノシリカの細胞内局在と安全性の連関に関する基礎情報の集積., 第37回日本トキシコロジー学会学術年会, 那覇(沖縄), 2010年6月.
7. 森下裕貴, 吉岡靖雄, 山下浩平, 東阪和馬, 吉田徳幸, 藤村真穂, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 今澤孝喜, 河合裕一, 眞弓忠範, 伊藤徳夫, 吉川友章, 角田慎一, 堤 康央:ナノマテリアルの安全性確保に向けて:ナノマテリアルの次世代影響評価に向けた精巣組織への移行性に関する基礎的検討., 第37回日本トキシコロジー学会学術年会, 那覇(沖縄), 2010年6月.
8. 東阪和馬, 吉岡靖雄, 山下浩平, 森下裕貴, 吉田徳幸, 藤村真穂, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 吉川友章, 角田慎一, 堤 康央:ナノマテリアルの安全性確保に向けて:トキシコプロテオミクスによるナノマテリアルの安全性評価マーカーの探索に向けた基礎的検討., 第37回日本トキシコロジー学会学術年会, 那覇(沖縄), 2010年6月.
9. 山下浩平, 吉岡靖雄, 東阪和馬, 森下裕貴, 吉田徳幸, 藤村真穂, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 今澤孝喜, 味村和哉, 柳原 格,

- 齋藤 滋, 河合裕一, 眞弓忠範, 伊藤徳夫, 吉川友章, 角田慎一, 堤 康央: ナノマテリアルの安全性確保に向けて: 非晶質ナノシリカの生殖発生への影響に関する基礎評価., 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会, 那覇 (沖縄), 2010 年 6 月.
10. 栃木彩恵子, 吉川友章, 鍋師裕美, 仲里泰太郎, 松山恵吾, 平井敏郎, 近藤小百合, 赤瀬貴憲, 長野一也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 鎌田春彦, 今澤孝喜, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: ナノマテリアルの安全性確保に向けて: 表面性状に着目した非晶質ナノシリカの安全性向上に関する基礎情報., 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会, 那覇 (沖縄), 2010 年 6 月.
 11. 平井敏郎, 吉川友章, 鍋師裕美, 仲里泰太郎, 松山恵吾, 栃木彩恵子, 近藤小百合, 赤瀬貴憲, 長野一也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 鎌田春彦, 今澤孝喜, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: ナノマテリアルの安全性確保に向けて: 非晶質ナノシリカが抗原特異的免疫誘導に与える影響., 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会, 那覇 (沖縄), 2010 年 6 月.
 12. 吉岡靖雄, 森重智弘, 吉川友章, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 角田慎一, 向 洋平, 岡田直貴, 中川晋作, 堤 康央: ナノ含有食品の安全性確保および安全なナノ含有食品の開発に向けて: ナノ酸化チタンの形状と免疫系への影響., 第 100 回日本食品衛生学会学術講演会, 熊本(熊本), 2010 年 9 月.
 13. 吉田徳幸, 吉川友章, 栃木彩恵子, 平井敏郎, 宇治美由紀, 鍋師裕美, 伊藤徳夫, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの経口曝露における免疫攪乱作用の解析., 第 9 回次世代を担う若手ファーマ・フォーラム 2010, 京都(京都), 2010 年 10 月.
 14. 山下浩平, 東阪和馬, 森下裕貴, 藤村真穂, 潘 慧燕, 小椋健正, 伊藤徳夫, 吉川友章, 堤 康央: ナノマテリアルの安全性確保に向けて~非晶質ナノシリカの次世代への影響評価~, 第 9 回次世代を担う若手ファーマ・フォーラム 2010, 京都(京都), 2010 年 10 月.
 15. 吉川友章, 鍋師裕美, 吉田徳幸, 栃木彩恵子, 平井敏郎, 宇治美由紀, 伊藤徳夫, 吉岡靖雄, 堤 康央: ヒトの健康確保を目指したナノ安全科学研究とリスク解析への展開., 第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪(大阪), 2010 年 10 月.
 16. 吉田徳幸, 吉川友章, 栃木彩恵子, 平井敏郎, 宇治美由紀, 鍋師裕美, 伊藤徳夫, 吉岡靖雄, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの経口影響に関する基礎情報の収集., 第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪(大阪), 2010 年 10 月.
 17. 東阪和馬, 吉岡靖雄, 山下浩平, 藤村真穂, 森下裕貴, 潘慧燕, 小椋健正, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 伊藤徳夫, 吉川友章, 堤 康央: 安全なナノマテリアルの創製に向けた安全性評価マーカーの探索., 第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪(大阪), 2010 年 10 月.
 18. 森下裕貴, 吉岡靖雄, 山下浩平, 東阪和馬, 藤村真穂, 小椋健正, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 今澤孝喜, 河合裕一, 眞弓忠範, 伊藤徳夫, 吉川友章, 堤 康央: ナノマテリアルの安全性確保に向けた非晶質ナノシリカの精巢移行性・精巢機能障害性の検討., 第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪(大阪), 2010 年 10 月.
 19. 小野寺章, 内海雄太, 陶山裕平, 吉岡靖雄, 吉川友章, 眞弓忠範, 堤 康央, 河合裕一: Surface charge modification of silica nanoparticles reduces mouse sperm nanotoxicology., 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010), 神戸(兵庫), 2010 年 12 月.
 20. 山下琢矢, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤 康央: ナノマテリアルの安全性確保に向けて~非晶質ナノシリカの次世代への影響評価~, 第 9 回次世代を担う若手ファーマ・フォーラム 2010, 京都(京都), 2010 年 10 月.